

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-256767

(43) 公開日 平成8年(1996)10月8日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/20			C 1 2 N 9/20	
C 0 7 D 211/90			C 0 7 D 211/90	
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 1 2 P 41/00	J
C 1 2 P 41/00		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

// (C 1 2 N 9/20

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-28640

(22) 出願日 平成8年(1996)1月22日

(31) 優先権主張番号 特願平7-30093

(32) 優先日 平7(1995)1月25日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(72) 発明者 中西 雄二

愛知県西春日井郡西春日町大字九之坪西城屋

敷51 天野製薬株式会社中央研究所内

(72) 発明者 刈谷 金弥

愛知県西春日井郡西春日町大字九之坪西城屋

敷51 天野製薬株式会社中央研究所内

(72) 発明者 広瀬 芳彦

愛知県西春日井郡西春日町大字九之坪西城屋

敷51 天野製薬株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 立体選択性の改変されたリパーゼ及びそれを用いた光学活性体の製造法

(57) 【要約】

【目的】 光学活性な医薬品中間体の製造に用いる酵素の立体選択性の改変法に関する。

【構成】 1つ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することによって得ることができる、野生型酵素の立体選択性が逆転したリパーゼ及びその製造法。詳細には221位のアミノ酸がLeuに、266位のアミノ酸をLeuに、287位のアミノ酸をIleに置換されたシュードモナス属由来のリパーゼ或いは221位のアミノ酸がLeuに、265位のアミノ酸をLeuに、286位のアミノ酸をIleに置換されたシュードモナス属或いはクロモバクテリウム属由来のリパーゼであり、これらを用いた光学活性1, 4-ジヒドロピリジン化合物の製造方法を提供する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】1つ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することによって得ることができる、野生型酵素の立体選択性が逆転したリパーゼ。

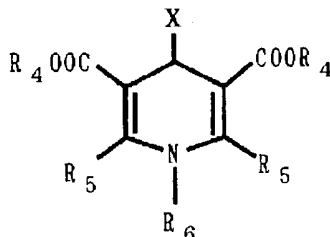
【請求項2】1つ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することにより、野生型酵素の立体選択性が逆転したリパーゼを製造する方法。

【請求項3】221位のアミノ酸がLeuに、266位のアミノ酸をLeuに、287位のアミノ酸をIleに置換されたシュードモナス属由来のリパーゼ。

【請求項4】221位のアミノ酸がLeuに、265位のアミノ酸をLeuに、286位のアミノ酸をIleに置換されたシュードモナス属或いはクロモバクテリウム属由来のリパーゼ。

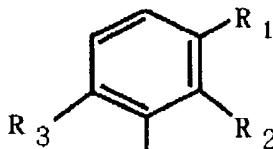
【請求項5】一般式〔I〕

【化1】



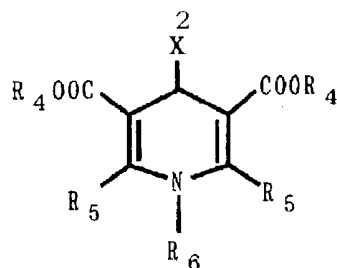
〔式中、Xは下記の一般式〔I I〕

【化2】



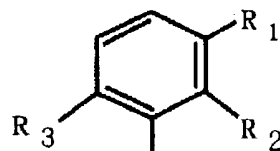
〔式中、R₁、R₂、R₃は同一でも異なってもよく、水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、ニトリル基又はトリフロロメチル基を表す。〕或いは、アルキル基を示し、R₄はアシルオキシメチル基、置換基を有するアシルオキシメチル基、アルコキシカルボニルオキシメチル基、(2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル)メチル基、(5-置換-2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル)メチル基又はアシル基を表し、R₅は低級アルキル基又は置換基を持つアルキル基を表し、R₆は水素原子、低級アルコキシメチル基又は低級アシルオキシメチル基を表す〕で表される1, 4-ジヒドロピリジン化合物に酵素を作用させ、一般式〔I I〕

【化3】



〔式中、Xは下記の一般式〔I I〕

10 【化4】



(式中、R₁、R₂、R₃は同一でも異なってもよく、水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、ニトリル基又はトリフロロメチル基を表す。)或いは、アルキル基を示し、R₄はアシルオキシメチル基、置換基を有するアシルオキシメチル基、アルコキシカルボニルオキシメチル基、(2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル)メチル基、(5-置換-2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル)メチル基又はアシル基を表し、R₅は低級アルキル基又は置換基を持つアルキル基を表し、R₆は水素原子、低級アルコキシメチル基又は低級アシルオキシメチル基を表し、*は光学活性点を表す〕で表される1, 4-ジヒドロピリジン化合物の合成方法において、請求項1、請求項3又は請求項4記載のリパーゼを用いることを特徴とする光学活性1, 4-ジヒドロピリジン化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、光学活性な医薬品中間体の製造に用いる酵素の立体選択性の改変法に関する。より詳細には光学活性な1, 4-ジヒドロピリジンモノカルボン酸化合物の製造に用いる酵素の立体選択性の改変法に関する。

【0002】

【従来の技術】1, 4-ジヒドロピリジンジカルボン酸エステル体の不斉加水分解反応に酵素を使用する方法は、既に知られ(特開平6-41075)、この酵素としてシュードモナス・セバシア(Pseudomonas cepacia)に由来するリパーゼ、例えばリパーゼAH、リパーゼPSが好ましいことも知られている(特開平5-284986)。

【0003】但し、これらの酵素を用いた場合においては、その立体選択性が異なっている。即ち、リパーゼAHを用いた場合にはS体を生成するが、リパーゼPSを用いた場合にはR体を生成する

50 【0004】

【発明が解決しようとする課題】このように使用する酵素によってその立体選択性が異なることがあるが、使用する酵素による立体選択性は今まで予測不能であり、目的の反応に合致する酵素のスクリーニング及び安価な酵素の製造法の確立が、酵素を利用した光学活性医薬品中間体の製造上大きな問題点であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】我々は、立体選択性が逆のリパーゼAH (*Pseudomonas cepacia* A-0727由来) とリパーゼPS (*Pseudomonas cepacia* M-12-33由来) の一次構造を既に明らかにした(特開平6-153965、特開平3-87187)。両リパーゼは相同性が95%と非常に高い事実から、我々はこれらの違いを鋭意検討した結果、僅かのアミノ酸の置換により立体選択性を逆転することができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】即ち、本発明は組換えDNA手法によって得ることができる、野生型酵素の立体選択性が逆転した新規リパーゼを提供する。更に本発明は、当該酵素を用いた光学活性1, 4-ジヒドロピリジン化合物の製造方法をも提供する。

【0007】リパーゼAH、リパーゼPSのアミノ酸配列を比較すると、何れのリパーゼも320アミノ酸より成り、95%のアミノ酸残基が一致している。(配列番号: 1及び配列番号: 2に示す。) よって、配列番号: 1及び配列番号: 2の下線で示した16ヶ所(28位、36位、40位、154位、187位、218位、221位、240位、243位、249位、256位、259位、266位、276位、287位、300位)のアミノ酸残基の違いの一部或いは全部が立体選択性の違いの原因と予想された。

【0008】本発明者等はこれらのアミノ酸をランダムに変異処理したところ、221位のPheをLeuに、266位のValをLeuに、287位のLeuをIleに置換することによってその立体選択性が逆転することを見出した。

【0009】更に、他のリパーゼ[例えば、*Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica*由来のリパーゼ(320アミノ酸よりなり配列番号: 3に示される)、*Pseudomonas* sp. KWI-56由来のリパーゼ(320アミノ酸よりなり配列番号: 4に示される)、*Pseudomonas cepacia* DSM3959由来のリパーゼ(320アミノ酸よりなり配列番号: 5に示される)]等も同様にこれらの位置(各配列図に下線で示す)を置換することによって立体選択性を逆転させることができる。

【0010】また、*Pseudomonas glumae* PG1由来のリパーゼ(319アミノ酸よりなり配列番号: 6に示される)及び*Chromobacterium viscosum*由来のリパーゼ(319アミノ酸よりなり配列番号: 7に示される)においては、221位のPheをLeuに、265位のValをLeuに、286位のLeuをIleに置換することによってその立体選択性が逆転する。

【0011】このように我々は部位特異的変換の手法を

用いて、立体選択性変換に関与するアミノ酸残基を特定することに成功した。このことは、先に述べた安価な酵素の製造法の確立に関しては、一種類の高発現宿主ベクター系が確立出来れば、立体選択性等諸性質の異なる酵素の生産には十分であることを実証した。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるリパーゼとしては、リパーゼPSとアミノ酸配列の相同性が高いものであればその起源は問わない。

【0013】例えば、*Pseudomonas* sp. KWI-56 [Agric. Biol. Chem., (1991)55,2349]、*Pseudomonas cepacia* DSM3959 [J. Bacteriol., (1991)173,559]、*Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* [特開平3-198778]、*Pseudomonas glumae* PG1 [Appl. Environ. Microbiol., (1992)58,3787]、*Chromobacterium viscosum* [特開平2-35083]由来のリパーゼ等が使用できる。本発明においては、リパーゼPSを用いた場合について詳述する。これ以外のリパーゼを用いた場合においても同様に本発明を適用することができる。

【0014】遺伝子組換えによる酵素の大量生産系にはいかなる宿主ベクター系を用いても良い。宿主微生物は原核生物、例えばグラム陰性菌、例えば*Escherichia coli*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas cepacia*等から選択された菌株でも良く、又*Bacillus*属、*Streptomyces*属細菌のようなグラム陽性菌でも良い。又宿主細胞は、真核生物、例えば*Saccharomyces*属などの酵母でも良く、又は*Aspergillus*属などの糸状菌でも良い。

【0015】最も好ましい宿主としては、本来のリパーゼ遺伝子を欠失させた*Pseudomonas cepacia* HW21株が挙げられる。

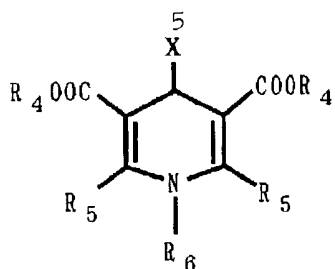
【0016】しかしながら、これらの何れの宿主・ベクター系においても、アミノ酸残基を置換したリパーゼ構造遺伝子と同時に、リパーゼ生産に必須の遺伝子(特開平3-87187)(activator, modulator, foldase, lipase-chaperone等と呼ばれる蛋白質をコードする)を共存させなければならない。

【0017】本明細書において部位特異的変異蛋白質は以下の如くアミノ酸の位置及び種類を、変異によって影響を受けた元のアミノ酸残基の名称: 突然変異の位置(アミノ酸番号): 元のアミノ酸残基に置換導入されたアミノ酸残基の名称を示す略式表記によって示す。例えば、10位のアロリンがアラニンで置換された突然変異体はPro10Alaと表記する。

【0018】一方、本発明のリパーゼを用いた不斉合成の基質として適する1, 4-ジヒドロピリジン化合物としては一般式(I)

【0019】

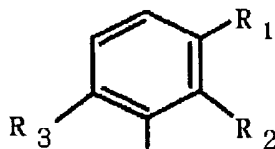
【化5】



【0020】〔式中、Xは下記の一般式〔II〕〕

【0021】

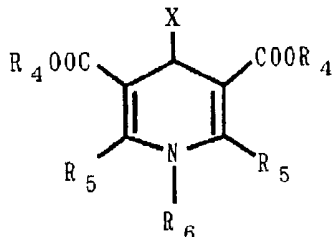
〔化6〕



【0022】〔式中、R₁、R₂、R₃は同一でも異なってもよく、水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、ニトリル基又はトリフロロメチル基を表す。〕或いは、アルキル基（例えばメチル基、ベンジル基、シクロヘキシル基等）を示し、R₄はアシルオキシメチル基（例えばビバロイルオキシメチル基等）、置換基を有するアシルオキシメチル基（例えば1-アセトキシエチル基等）、アルコキシカルボニルオキシメチル基（例えば1-（エトキシカルボニルオキシ）エチル基）、（2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル）メチル基、（5-置換-2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル）メチル基（例えば置換基としてはメチル基、エチル基等）又はアシル基（例えばビバロイル基等）を表し、R₅は低級アルキル基（例えばメチル基、エチル基等）又は置換基を持つアルキル基（例えば置換基としては弗素、塩素、水酸基、低級アルコキシ基等）を表し、R₆は水素原子、低級アルコキシメチル基（例えばメトキシメチル基、エトキシメチル基等）又は低級アシルオキシメチル基（例えばビバロイルオキシメチル基等）を表す〕で表されるアロキラルな1, 4-ジヒドロピリジン化合物であり、これを本発明のアミノ酸置換リパーゼを用いた酵素触媒によって立体選択的に加水分解し、一般式〔II〕

【0023】

〔化7〕

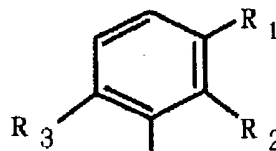


6

【0024】〔式中、Xは下記の一般式〔II〕〕

【0025】

〔化8〕



10 【0026】〔式中、R₁、R₂、R₃は同一でも異なってもよく、水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、ニトリル基又はトリフロロメチル基を表す。〕或いは、アルキル基（例えばメチル基、ベンジル基、シクロヘキシル基等）を示し、R₄はアシルオキシメチル基（例えばビバロイルオキシメチル基等）、置換基を有するアシルオキシメチル基（例えば1-アセトキシエチル基等）、アルコキシカルボニルオキシメチル基（例えば1-（エトキシカルボニルオキシ）エチル基）、（2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル）メチル基、（5-置換-2-オキソ-1, 3-ジオキソレン-4-イル）メチル基（例えば置換基としてはメチル基、エチル基等）又はアシル基（例えばビバロイル基等）を表し、R₅は低級アルキル基（例えばメチル基、エチル基等）又は置換基を持つアルキル基（例えば置換基としては弗素、塩素、水酸基、低級アルコキシ基等）を表し、R₆は水素原子、低級アルコキシメチル基（例えばメトキシメチル基、エトキシメチル基等）又は低級アシルオキシメチル基（例えばビバロイルオキシメチル基等）を表す〕で表される1, 4-ジヒドロピリジン化合物を生成し、その不斉収率、反応収率共に満足する結果を得ることができ、変異前のリパーゼP Sとは逆の立体配座を有する光学活性体を得ることができる。

30

【0027】本発明の反応は通常0から40℃、1から150時間で行い、反応系に酵素が分散するように行うのが好ましい。反応に使用する酵素量は使用する酵素の純度によって変化するが、基質に対する重量比で5%以上であれば良い。又、酵素はそのまま用いても良いが、適当な担体に固定化して用いても良い。

40

【0028】本発明の反応は、通常は水を含む有機溶媒中で行われる。使用する有機溶媒としては特に制限されるものではないが、例えば、ジエチルエーテル、イソプロピルエーテル、エタノール、メタノール、アセトン、ベンゼン、クロロホルム等を挙げることができる。反応終了後に、酵素は常法に従って、例えば、濾紙を用いた濾過等で簡単に除くことができる。反応生成物は、例えば水を多く含む場合はクロロホルム、ベンゼン、ジエチルエーテル等で抽出・分離できる。更に生成物は例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製できる。

50 【0029】以下に実施例を用いて本発明を具体的に説

明するが、本願発明はこれらによって何等限定されるものではない。

【0030】

【実施例】

実施例1

(1) リパーゼ遺伝子欠損宿主菌の構築

Pseudomonas cepacia M-12-33 (FERM BP-2293) をニトロソグアニジン処理してグリシン、セリン要求性変異株 *Pseudomonas cepacia* HW15 を分離した。本株は3-フォスホヒドロキシビルビン酸を添加した合成培地では生育せず、3-フォスホセリン添加で生育可能なことから、フォスホセリントランスアミナーゼ遺伝子 (serC 遺伝子) 上に変異点があることを明らかにした。

【0031】 *Pseudomonas cepacia* M-12-33 の染色体 DNA (調製法は特開平3-87187に従った) 5.0 μg をとり、制限酵素 *EcoRI* を添加し 37°C で15分間部分分解した。

【0032】 ベクター pFL210 (特開平6-153965に記載) 2.5 μg に制限酵素 *EcoRI* を加え、37°C、2時間反応させ完全に分解した後、アルカリ性フォスファターゼにより脱リン酸化した。

【0033】 両DNAを混合し、DNAリガーゼを加え、16°Cで一晩反応させた。連結したDNAをエレクトロポレーション法で *Pseudomonas cepacia* HW15 に導入し、グルコース 0.2%、KH₂PO₄ 0.3%、Na₂HPO₄ 0.6%、NH₄Cl 0.1%、NaCl 0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.025%、CaCl₂·2H₂O 0.015%、寒天 1.5%、カナマイシン 500 μg/ml を含む寒天培地上で生育するコロニーを選択した。選択した形質転換体は何れも、serC 遺伝子を含む 1.8Kb *EcoRI* 断片を含んでいた。この断片の制限酵素切断地図を図2に示す。

【0034】 *Pseudomonas cepacia* M-12-33 の染色体より分離したリパーゼ構造遺伝子 (lipA)、リパーゼ発現に必須な遺伝子 (lipX) を含む 6.1Kb *EcoRV* 断片を大腸菌用ベクター pBR322 の *PvuII* 切断部位に導入した。

【0035】 得られたプラスミドを *XhoI*、*PvuII* で完全分解し、Klenow断片で平滑末端化した。上記記載の serC 遺伝子を含む 1.8Kb *EcoRI* 断片を同様に平滑末端化し、両DNAを連結して、大腸菌 *Escherichia coli* C600 に導入し、lipA、lipX 両遺伝子の代わりに serC 遺伝子の挿入されたプラスミドを構築した。このプラスミドをエレクトロポレーション法で *Pseudomonas cepacia* HW15 に導入し、カナマイシン 500 μg/ml を除いた上記合成培地に生育し、更に 0.1% 乳化トリオレインを含む LB 培地 (トリプトン 0.1%、イーストエキストラクト 0.5%、NaCl 1.0%、寒天 1.5%) 上でハローを形成しない菌株を分離し、*Pseudomonas cepacia* HW21 と命名した。

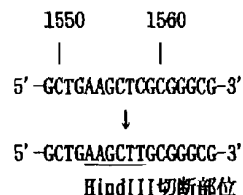
【0036】 *Pseudomonas cepacia* HW21 の染色体 DNA 上に lipA、lipX 遺伝子は存在せず、serC 遺伝子が 2 個 (一方は M-12-33 株由来、他方は HW15 株由来) 存在する

ことをサザンハイブリダイゼーション法で確認した。

【0037】 (2) アミノ酸置換発現用ベクター pLiP23 の構築

リパーゼ PS 構造遺伝子の C 末端部分に部位特異的変異法 [Kunkel, J.A. et al. (1987) 「Method Enzymol.」 154, 367] を用いて新たに *HindIII* 切断部位を創製した。

【0038】



【0039】 この *HindIII* 切断部位を含む 3Kb *ClaI*-*SmaI* 断片をベクター pFL210 に導入し、発現ベクター pLiP23 を構築した。(図3)

【0040】 (3) アミノ酸置換リパーゼの生産

MluI-*HindIII* 断片を使用して部位特異的変異法により変異を導入した。この断片を pLiP23 中に連結し、*Pseudomonas cepacia* HW21 を形質転換した。形質転換体を大豆油 2.0%、ペプトン 0.5%、肉エキス 0.3%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.02%、FeSO₄·7H₂O 0.001%、アデカノール 0.005% より成る液体培地を含む坂口フラスコに接種し、30°C、3日間振盪培養した。遠心分離により得た上澄液を凍結乾燥し、アミノ酸置換リパーゼ約 500mg を得た。

【0041】 実施例2

水を飽和したイソプロピルエーテル 1ml にビス (プロピオニルオキシメチル) 1, 4-ジヒドロ-2, 6-ジメチル-4- (m-ニトロフェニル)-3, 5-ピリジンジカルボキシレート 25mg を溶解し、リパーゼ PS 25mg を加え、20°C で攪拌しながら反応を行った。不溶物を濾過し、ジクロロメタンで洗浄後、濾液を減圧濃縮し結晶を得た。

【0042】 生成物の絶対配置は旋光度測定により決定した。生成物をジアゾメタンのジエチルエーテル溶液で処理し、キラルセル (Chiralcel) AD を付した高速液体クロマトグラフィー (エタノール/ヘキサン = 1/19) にかけて光学純度を測定した。

【0043】 実施例3

実施例1に従って作製・調製した各種アミノ酸置換体を用いて、実施例2の方法で立体選択性を測定した。その結果を表1に示した。但し、表1において、% e.e. 欄に * 印がある場合は基質としてビス (ヒバロイルオキシメチル) 1, 4-ジヒドロ-2, 6-ジメチル-4- (m-ニトロフェニル)-3, 5-ピリジンジカルボキシレートを使用した結果を示す。

【0044】

【表1】

アミノ置換体	%ee	R S
Glu28Asp	94.3	R
Asp36Asn	98.3	R
Arg40His	95.4	R
Asn154His	91.6	R
Pro187Ser	99.0	R
Ile218Phe	92.8	R
Phe221Leu	89.8	R
Ala240Val	93.7	R
Pro243Leu	94.3	R
Phe249Leu	96.2	R
Val256Ile	95.2	R
Gly259Ala	93.0	R
Val266Leu	63.6	R
Gln276Lys	94.9	R
Leu287Ile	76.9	R
Asn300Tyr	96.9	R
Phe221Leu, Val266Leu	97.8	R
Phe221Leu, Leu287Ile	63.0	R
Val266Leu, Leu287Ile	78.5	R
Phe221Leu, Val266Leu, Leu287Ile	58.8	S
Phe221Leu, Val266Leu, Leu287Ile	99.9*	S
Lipase PS	99.0	R

【0045】221番目のPheをLeuに、266番目のValをLeuに、更に287番目のLeuをIleに変換することにより立体選択性の交換に成功した。

【0046】

【発明の効果】本発明は、Pseudomonas cepacia M-12-3由来のリパーゼPSの3つのアミノ酸置換体を作成することにより、その立体選択性を交換することに初めて成功した。本発明により酵素触媒を用いた不斉合成反応*

*に用いる酵素の特異性の交換においても蛋白工学的手法が有効なことが示された。

【0047】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

配列

Ala Asp Asn Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His	15
Gly Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Asp Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Glu Asn Leu Gln Gln His Gly Ala Thr Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Thr Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asn Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Lys	165

(7)

特開平8-256767

1 1

1 2

Thr Leu Thr Thr Ala Gln Ala Ala Thr Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Pro	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Leu Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Val	240
Leu Asp Leu Ser Thr Leu Ala Leu Leu Gly Thr Gly Thr Val Met	255
Ile Asn Arg Ala Ser Gly Gln Asn Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys	270
Ser Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn	285
His Ile Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Tyr	300
Ala Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu	315
Lys Leu Ala Gly Val	320

【0048】配列番号：2

*配列の型：アミノ酸

配列の長さ：320

*

配列

Ala Asp Asn Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His	15
Gly Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Glu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Thr Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Thr Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr	150
Ser Ser Ser Asn Asn Thr Asn Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Lys	165
Thr Leu Thr Thr Ala Gln Ala Ala Thr Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Pro	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Ile Ser Val Phe Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Ala	240
Leu Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met	255
Val Asn Arg Gly Ser Gly Gln Asn Asp Gly Val Val Ser Lys Cys	270
Ser Ala Leu Tyr Gly Gln Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn	285
His Leu Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn	300
Ala Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu	315
Lys Leu Ala Gly Val	320

【0049】配列番号：3

※配列の型：アミノ酸

配列の長さ：320

※

配列

Ala Asp Asp Tyr Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His	15
Gly Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Glu Asp Leu Gln Gln His Gly Ala Thr Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Ser Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asn Gln Asp Ala Leu Ala Ser Leu Lys	165

(8)

特開平8-256767

1 3

1 4

Thr Leu Thr Thr Ala Gln Ala Ala Ala Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Pro	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Leu Ser Val Phe Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Ala	240
Leu Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met	255
Ile Asn Arg Gly Ser Gly Pro Asn Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys	270
Ser Ala Leu Tyr Gly Gln Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn	285
His Ile Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn	300
Ala Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu	315
Lys Leu Ala Gly Val	320

【0050】配列番号: 4

* 配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 320

*

配列

Ala Asp Gly Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His	15
Gly Leu Ser Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Val Glu Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Glu Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Thr Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Ala Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Asn Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Ser Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asn Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Gln	165
Thr Leu Thr Thr Ala Arg Ala Ala Thr Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Pro	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Leu Ser Val Phe Gly Ile Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Val Pro Leu Val Asp Leu Ala Asn Val	240
Leu Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met	255
Ile Asn Arg Gly Ser Gly Gln Asn Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys	270
Ser Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn	285
His Leu Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Tyr	300
Ala Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu	315
Lys Leu Ala Gly Val	320

【0051】配列番号: 5

※配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 320

※

配列

Ala Ala Gly Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His	15
Gly Leu Ser Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Glu Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Thr Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Ser Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Pro Ala Asp Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Asp Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Ser Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asn Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Gln	165

(9)

特開平8-256767

15

16

Thr Leu Thr Thr Ala Arg Ala Ala Thr Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Pro	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Leu Ser Val Phe Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Leu Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Val	240
Leu Asp Leu Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met	255
Ile Asn Arg Gly Ser Gly Gln Asn Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys	270
Ser Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn	285
His Leu Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Tyr	300
Ala Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu	315
Lys Leu Ala Gly Val	320

【0052】配列番号：6

* 配列の型：アミノ酸

配列の長さ：319

*

配列

Ala Asp Thr Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Val Ile Leu Val His	15
Gly Leu Ala Gly Thr Asp Lys Phe Ala Asn Val Val Asp Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Ser Asp Leu Gln Ser His Gly Ala Lys Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Gln Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Gln Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Asp Val Leu Lys Thr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Thr Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Thr Leu Val	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asp Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Arg	165
Thr Leu Thr Thr Ala Gln Thr Ala Thr Tyr Asn Arg Asn Phe Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Ala	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Ser Gln His Leu Leu Tyr Ser Trp Gly	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Ser Thr Val Leu Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Gly Thr Leu Asp Val Ala Asn Val Thr	240
Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Val Met Ile	255
Asn Arg Ala Ser Gly Gln Asn Asp Gly Leu Val Ser Arg Cys Ser	270
Ser Leu Phe Gly Gln Val Ile Ser Thr Ser Tyr His Trp Asn His	285
Leu Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn Ala	300
Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Val Asn Arg Leu Lys	315
Leu Gln Gly Val	319

【0053】配列番号：7

※配列の型：アミノ酸

配列の長さ：319

※

配列

Ala Asp Thr Tyr Ala Ala Thr Arg Tyr Pro Val Ile Leu Val His	15
Gly Leu Ala Gly Thr Asp Lys Phe Ala Asn Val Val Asp Tyr Trp	30
Tyr Gly Ile Gln Ser Asp Leu Gln Ser His Gly Ala Lys Val Tyr	45
Val Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly	60
Arg Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Gln Val Leu Ala Ala	75
Thr Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser Gln Gly Gly	90
Leu Thr Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Gln Leu Val Ala	105
Ser Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Gly Ser Glu Phe Ala	120
Asp Phe Val Gln Asp Val Leu Lys Thr Asp Pro Thr Gly Leu Ser	135
Ser Thr Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Thr Leu Val	150
Ser Ser Ser His Asn Thr Asp Gln Asp Ala Leu Ala Ala Leu Arg	165

17	18
Thr Leu Thr Thr Ala Gln Thr Ala Thr Tyr Asn Arg Asn Phe Pro	180
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gln Thr Gly Ala Ala	195
Thr Glu Thr Val Gly Gly Ser Gln His Leu Leu Tyr Ser Trp Gly	210
Gly Thr Ala Ile Gln Pro Thr Ser Thr Val Leu Gly Val Thr Gly	225
Ala Thr Asp Thr Ser Thr Gly Thr Leu Asp Val Ala Asn Val Thr	240
Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Val Met Ile	255
Asn Arg Ala Ser Gly Gln Asn Asp Gly Leu Val Ser Arg Cys Ser	270
Ser Leu Phe Gly Gln Val Ile Ser Thr Ser Tyr His Trp Asn His	285
Leu Asp Glu Ile Asn Gln Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn Ala	300
Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Val Asn Arg Leu Lys	315
Leu Gln Gly Val	319

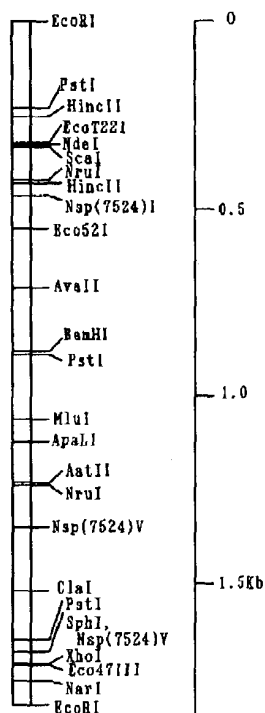
【図面の簡単な説明】

* 離したリパーゼ構造遺伝子の制限酵素切断地図を示す。

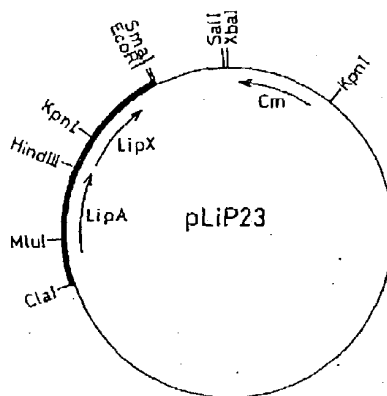
【図1】 *Pseudomonas cepacia* M-12-33の染色体より分 *

【図2】 ベクターpLip23を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:38)

(C12N 15/09

ZNA

C12R 1:38)

(72) 発明者 佐々木 征治

愛知県西春日井郡西春日大字九之坪西城屋

敷51 天野製薬株式会社中央研究所内

PAT-NO: JP408256767A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08256767 A
TITLE: LIPASE MODIFIED IN STEREOSELECTIVITY AND
PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE SUBSTANCE USING THE SAME
PUBN-DATE: October 8, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME
NAKANISHI, YUJI
KARIYA, KINYA
HIROSE, YOSHIHIKO
SASAKI, SEIJI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
AMANO PHARMACEUT CO LTD	N/A

APPL-NO: JP08028640
APPL-DATE: January 22, 1996

INT-CL (IPC): C12N009/20, C07D211/90 , C12N015/09 , C12P041/00

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide a method for modifying stereoselectivity of enzyme used for producing optically active medicine intermediates.

CONSTITUTION: This lipase is obtainable by replacing one or more amino acid residues with other amino acids to reverse stereoselectivity of a wild type enzyme. The method for producing an optically active substance comprises using the lipase. Specifically, this lipase is the one derived from the genus Pseudomonas obtained by respectively replacing the 221st amino acid with Leu, the 266th amino acid with Leu, and the 287th amino acid with Ile or the one derived from the genus Pseudomonas or Chromobacterium obtained by respectively replacing the 221st amino acid with Leu, the 265th amino acid with Leu and the 286th amino acid with Ile, and the method for producing an optically

active

1,4-dihydropyridine compound comprises using this lipase.

COPYRIGHT: (C)1996, JPO

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **08-256767**
 (43)Date of publication of application : **08.10.1996**

(51)Int.Cl. **C12N 9/20**
C07D211/90
C12N 15/09
C12P 41/00
 // (**C12N 9/20**
C12R 1:38)
(C12N 15/09
C12R 1:38)

(21)Application number : **08-028640** (71)Applicant : **AMANO PHARMACEUT CO LTD**
 (22)Date of filing : **22.01.1996** (72)Inventor : **NAKANISHI YUJI**
KARIYA KINYA
HIROSE YOSHIHIKO
SASAKI SEIJI

(30)Priority
 Priority number : **07 30093** Priority date : **25.01.1995** Priority country : **JP**

(54) **LIPASE MODIFIED IN STEREOSELECTIVITY AND PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE SUBSTANCE USING THE SAME**

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for modifying stereoselectivity of enzyme used for producing optically active medicine intermediates.

CONSTITUTION: This lipase is obtainable by replacing one or more amino acid residues with other amino acids to reverse stereoselectivity of a wild type enzyme. The method for producing an optically active substance comprises using the lipase. Specifically, this lipase is the one derived from the genus *Pseudomonas* obtained by respectively replacing the 221st amino acid with Leu, the 266th amino acid with Leu, and the 287th amino acid with Ile or the one derived from the genus *Pseudomonas* or *Chromobacterium* obtained by respectively replacing the 221st amino acid with Leu, the 265th amino acid with Leu and the 286th amino acid with Ile, and the method for producing an optically active 1,4-dihydropyridine compound comprises using this lipase.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Lipase which the stereoselectivity of the wild type enzyme which can be obtained by permuting one or more amino acid residue by other amino acid reversed.

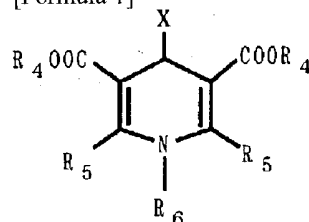
[Claim 2] How to manufacture the lipase which the stereoselectivity of a wild type enzyme reversed by permuting one or more amino acid residue by other amino acid.

[Claim 3] Lipase of the Pseudomonas origin by which the amino acid of the 221st place had the amino acid of the 266th place permuted by Leu, and was permuted by Leu by Ile in the amino acid of the 287th place.

[Claim 4] Lipase of Pseudomonas by which the amino acid of the 221st place had the amino acid of the 265th place permuted by Leu, and was permuted by Leu by Ile in the amino acid of the 286th place, or the Chromobacterium origin.

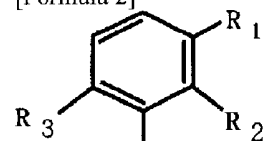
[Claim 5] General formula [I]

[Formula 1]



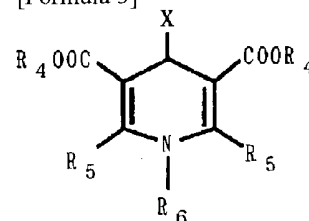
The inside of [type and X are the following general formula [II].

[Formula 2]



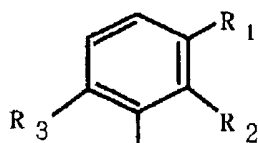
(Among a formula, even if R₁, R₂, and R₃ are the same, they may differ from each other, and they express a hydrogen atom, a halogen atom, a nitro group, a nitrile group, or a TORIFUORO methyl group.) or The acyloxy methyl group in which an alkyl group is shown and R₄ has an acyloxy methyl group and a substituent, An alkoxy carbonyl oxymethyl radical, a methyl group (2-oxo-- 1, 3-JIOKISOREN-4-IRU), A methyl group or an acyl group is expressed. (5-permutation-2-oxo-- 1, 3-JIOKISOREN-4-IRU) R₆ makes an enzyme act on 1 expressed with] showing a hydrogen atom, a low-grade alkoxy methyl group, or a low-grade acyloxy methyl group, and a 4-dihydropyridine compound by R₅ expressing an alkyl group with a low-grade alkyl group or a substituent, and it is a general formula [III].

[Formula 3]



The inside of [type and X are the following general formula [II].

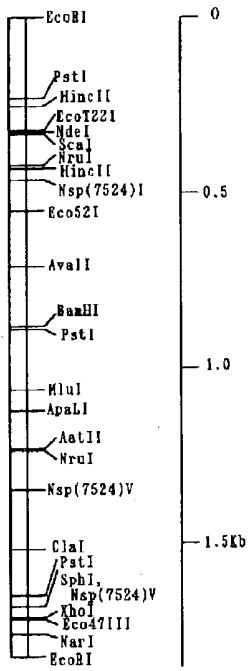
[Formula 4]



(Among a formula, even if R1, R2, and R3 are the same, they may differ from each other, and they express a hydrogen atom, a halogen atom, a nitro group, a nitrile group, or a TORIFURORO methyl group.) or The acyloxy methyl group in which an alkyl group is shown and R4 has an acyloxy methyl group and a substituent, An alkoxy carbonyl oxymethyl radical, a methyl group (2-oxo-- 1, 3-JIOKISOREN-4-IRU), A methyl group or an acyl group is expressed. (5-permutation-2-oxo-- 1, 3-JIOKISOREN-4-IRU) R5 expresses an alkyl group with a low-grade alkyl group or a substituent. R6 A hydrogen atom, In the synthetic approach of a 1 and 4-dihydropyridine compound expressed with] to which a low-grade alkoxy methyl group or a low-grade acyloxy methyl group is expressed, and * expresses an optical-activity point The manufacture approach of claim 1, the optical activity 1 characterized by using lipase according to claim 3 or 4, and a 4-dihydropyridine compound.

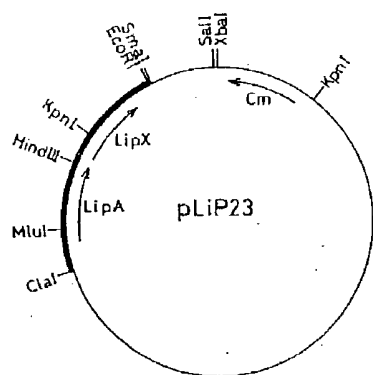
[Translation done.]

Drawing selection drawing 1 ▼



[Translation done.]

Drawing selection drawing 2 ▼



[Translation done.]